

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Pablo Tavares Coimbra

**PRODUÇÃO E CONTROLE DE ITENS DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA PARA OS
ENSAIOS DE CONTAGEM DE BACTÉRIAS MESÓFILAS E PESQUISA DE
Escherichia coli EM ÁGUA**

Rio de Janeiro

2018

Pablo Tavares Coimbra

**PRODUÇÃO E CONTROLE DE ITENS DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA PARA OS
ENSAIOS DE CONTAGEM DE BACTÉRIAS MESÓFILAS E PESQUISA DE
Escherichia coli EM ÁGUA**

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutora: Carla de Oliveira Rosas
Preceptora: Valéria de Mello Medeiros

Rio de Janeiro, RJ

2018

Coimbra, Pablo

PRODUÇÃO E CONTROLE DE ITENS DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA PARA OS ENSAIOS DE CONTAGEM DE BACTÉRIAS MESÓFILAS E PESQUISA DE *Escherichia coli* EM ÁGUA. / Pablo Coimbra. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2018.

34 f. : fig. ; tab.

Monografia (Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

Orientadora: Carla de Oliveira Rosas.

Co-orientadora: Valéria de Mello Medeiros.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Água. 2. Bactérias mesófilas. 3. *Escherichia coli*. 4. Itens de Ensaio. 5. Ensaio de Proficiência. I. Título.

PRODUCTION AND CONTROL OF PROFICIENCY TEST ITEMS FOR THE COUNT OF MESOPHILIC BACTERIA IN WATER AND THE *Escherichia coli* WATER RESEARCH ASSAY.

Pablo Tavares Coimbra

**PRODUÇÃO E CONTROLE DE ITENS DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA PARA OS
ENSAIOS DE CONTAGEM DE BACTÉRIAS MESÓFILAS E PESQUISA DE
Escherichia coli EM ÁGUA**

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Ivano Raffaele Victorio de Phillipis Capasso (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Rafael Lawson Ferreira (Mestre)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Maria Regina Branquinho (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

A minha Mãe Valcira, Tia Bárbara,
Avós Maria do Carmo e Jacira por serem
exemplos de luta, fibra, moral e amor.

AGRADECIMENTOS

Graças a Olorum sempre que com seus orixás e toda a falange de caboclos, pretos velhos e erês guiam meu caminho e estrada. Tenho neles a minha fé e verdade, sendo eles a luz que nunca se apaga e o socorro em todas as horas. Axé!

A Deusa Mãe, Irmã e Amiga pela dádiva de ser um operário do bem e estar sempre sendo amparado por toda legião de luz dos arcanjos, elementais da terra, fogo, ar e água somados as todas as criaturas celestes.

Minha mãe Valcira, minha vida, meu amor obrigado por ter me dado junto com meu pai o maior bem que é a vida. Através de você eu cheguei até aqui e sei que não seria nada sem seu apoio, amor e dedicação. Nunca me esquecerei da sua doce presença na minha vida. Por trás de todo homem tem uma mãe presente e dedicada. Te amo e amarei por quantas existências eu tiver.

Minha vó Maria do Carmo (*in memoriam*) impossível não agradecer a sua presença hoje em espírito, mas essencial em minha vida desde sempre. Você me ensinou a fé inabalável e verdadeira através das forças da natureza e dos orixás. Sua devoção e amor desmedido demonstrado de forma sutil nunca será esquecido. Que Oyá Iamberecy nos valha sempre!

Minha vó Jacira por ser exemplo de fibra, luta e superação. O seu maior ensinamento foi a gratidão. Muito antes dessa palavra estra na moda você sempre nos ensinou a ser grato para quem nos entende a mão. Você é a vó mais linda do mundo e sou extremamente grato ao universo pela sua presença em minha vida. Te amo!

Tia Barbara muito obrigado por cada palavra, conselho e conversa. Você demonstra amor em gestos simples que fazem o meu dia mais feliz e cheio de luz. Sua presença é fundamental na minha vida desde a infância. Os valores ensinados por você são muito úteis e tenho a certeza de que ainda colheremos muitas flores. Tenho um orgulho imenso de ser seu sobrinho e praticamente seu filho. Obrigado por me dar junto ao Tio Augusto um primo e afilhado lindo e atenciososo como o Tainã.

Meu irmão Diego obrigado por ser esse exemplo de homem dedicado ao trabalho e extremamente generoso com quem está a sua volta. Você como homem mais velho da casa

sempre me deu bons exemplos e mostrou que com trabalho e responsabilidade vencemos as barreiras impostas pela vida. Com a sua família Gisele e Davi que são minha família também possamos sempre ter bons momentos e mantermos a união e amor no nosso lar.

Minhas primas irmãs Lélia, Liliana e minha afilhada querida Stephanie vocês são uma das maiores preciosidades da minha vida. Desde muito pequeno percebi o quanto vocês duas seriam importantes na minha vida. Não precisamos nascer da mesma mãe para sermos irmãos e nos amarmos de verdade. Fico imensamente feliz em ver o quanto vocês se desenvolveram nesses anos de convivência. Minha afilhada que você retribua todo amor que sua mãe e tia tem por você. Minha vida é mais colorida pela presença de vocês na minha vida. Amo vocês!

Minha amiga, irmã e comadre Lorena obrigado por ser essa presença constante na minha vida. Sua amizade é uma preciosidade na minha vida. Sei dos desafios ao qual fomos impostos no último ano, mas temos a certeza de que nossa amiga Tatiana de Souza (*in memorian*) está feliz e na companhia dos bons espíritos nos protegendo e tomando conta da Laurinha. Lorena estaremos sempre juntos em todos os momentos bons e ruins. Te amo minha amiga!

Camilla e Diogo obrigado por mesmo estarmos a quilômetros e quilômetros de distância vocês nunca deixarem de me dar uma palavra de apoio e carinho. A amizade de vocês é essencial para minha vida. Vocês são os melhores amigos irmãos que um ser humano pode ter. Amo vocês!

Claudia obrigado por ser presença constante na minha vida e sempre torcer por mim. Realmente não existe melhor exemplo de amizade e dedicação como a sua. Não só pelos áudios intermináveis, mas por tornar meus dias mais felizes e dividirmos as nossas alegrias e tristezas. Coração, te amo!

Bruno você foi o mais surpreendente presente que a vida me deu no último ano. A sua chegada transformou minha existência num jardim mais florido e repleto de luz. As palavras são poucas para descrever a alegria de estar de bem com a vida ao seu lado. Você é um exemplo de garra, determinação e dedicação sem sombra de dúvidas você me inspira a crescer, pois pessoas como você são artigos raros e preciosos. Obrigado por trazer toda sua doçura e afabilidade para minha vida. Meu amor, te amo!

A minha eterna Malvada Favorita, Professora, Fada Madrinha e Deusa Michele Feitoza. Você é fonte de inspiração e exemplo de profissional. Tenho certeza de que nossa amizade vem de muitas outras vidas. Obrigado por ser um ponto de luz no meu caminho!

As meninas da minha turma R2 de Residência Multiprofissional em Vigilância Sanitária pelo apoio e carinho para comigo. Sophia minha musa do verão obrigado por ser uma amiga sensacional e irmã de jujuba que quero levar para toda a vida; Gleice que mulher iluminada, determinada e amiga desejo para você o futuro mais lindo; Paulinha nunca esquecerei de o quanto você me ajudou num momento de dificuldade que eu atravessava muito obrigado do fundo do meu coração; Luiza obrigado por ter me acolhido e dividido seus conhecimentos comigo, você é uma mulher sensacional e terá um futuro brilhante como seu sorriso; Vanessinha você não está mais na nossa turma, porém sempre estará no meu coração; Gabi você é doce como sua presença continue a espalhar amor por onde quer que você passe; Nathalia um presente que a residência me deu saiba que sempre levarei sua amizade com carinho em meu coração você é uma menina de ouro, Thaiz doce e suave como as águas de um lago que nosso Mestre Jesus te abençoe sempre tenho um carinho imenso por você; Monique que eu possa sempre te reencontrar na minha vida, você é uma mulher de fibra e guerreira nata torço e vibro pela sua felicidade minha delícia e Tainá surpresa boa e que conquistou meu coração desde a primeira vez que a vi saiba que tenho uma enorme admiração por você e quero ser seu amigo para sempre sua linda e Laís desejo uma jornada luminosa para você.

As secretárias da pós-graduação do INCQS Giselle Custódio, Jessica Lagos e Samela Ribeiro além de serem o secretariado mais lindo do Brasil vocês também nesses dois anos foram presença fundamental no meu dia a dia. Não tenho dúvidas de que a amizade de vocês foi fundamental na minha jornada no INCQS. Sentirei muitas saudades dos nossos papos, almoços e lanches. Vou sempre trazer empadinha de queijo para vocês. Amo vocês!

A turma R1 de Residência Multiprofissional em Vigilância Sanitária pela oportunidade de estar em contato com futuros profissionais de vigilância sanitária e pela troca de experiências. Em especial ao meu amigo Felipe que torna meus dias no INCQS mais leves e repletos de diversão. Que você tenha uma estrada maravilhosa e repleta de conquistas, que a nossa amizade perdure por muito anos.

A equipe do Núcleo de Alimentos, Microscopia e Métodos Rápidos e em especial a Juliana Machado dos Santos responsável pelo Laboratório de Microscopia de Alimentos pela partilha de conhecimentos e pela presença essencial na minha formação profissional. Que Deus continue te abençoando e iluminando sempre. Muito obrigado por tudo!

A minha tutora Carla de Oliveira Rosas por ser exemplo de dedicação ao INCQS e profissionalismo. A oportunidade dada para o meu crescimento profissional ao me acolher em seu laboratório nunca será esquecida. Você é um exemplo não só de profissional, mas de mãe, amiga e filha. Peço a Deus que sempre ilumine e faça da sua jornada aqui nesse plano mais leve e abençoada. Obrigado por tudo de coração!

A minha preceptora Valéria de Mello Medeiros Rosas pela doce presença e ensinamentos dentro do laboratório. O amor como você conduz seu trabalho, família e amizades são encantadores e te tornam um ser humano inigualável. Muito obrigado por tudo durante esse período em que fui residente no laboratório de microbiologia de alimentos.

A Silvia Maria Lopes por sempre estar presente para tirar minhas dúvidas relacionadas aos assuntos do laboratório ou da área de microbiologia. Você é um exemplo de profissionalismo pelo domínio do conteúdo e a forma clara como você passa os seus conhecimentos. Tenho a certeza de que sua presença na minha vida profissional foi essencial.

Ao Marcelo Brandão pelos conhecimentos divididos e sempre estar disposto a me dar orientação e ajuda quando preciso. Você terá um futuro brilhante e abençoado.

Ao Doutor Ivano Capasso, a Doutora Maria Regina Branquinho, ao Mestre Rafael Lawson Ferreira, a Doutora Renata Trotta Ferreira Barroso por terem aceito participarem da minha banca examinadora do trabalho de conclusão do curso de Residência Multiprofissional em Vigilância Sanitária. Através dos seus conhecimentos irão contribuir para o enriquecimento do meu trabalho.

Aos meus amigos, colegas e conhecidos que adquiri no INCQS e torcem pela minha vitória e realização profissional o meu mais sincero obrigado.

Lembre-se da sabedoria da água.
Ela nunca briga com o obstáculo.
Ela simplesmente o contorna.

(I ching – Oráculo Chinês)

RESUMO

A garantia do desempenho analítico pode ser verificada através da participação do laboratório em ensaios de proficiência (EP), que são considerados ferramentas externas de garantia da qualidade. Os EP consistem no uso de comparações interlaboratoriais, com o propósito de avaliar a habilidade de laboratórios em realizar um determinado ensaio ou medição de modo competente e demonstrar a confiabilidade dos resultados gerados. O presente trabalho teve como objetivo produzir lotes de itens de ensaio (IE) para serem utilizados em duas rodadas de EP nos ensaios de contagem de bactérias mesófilas e pesquisa de *Escherichia coli* em água de abastecimento. Os procedimentos de preparo dos IE e as análises de controle foram realizados no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz. Foram produzidos dois lotes: um utilizando a cepa de *E. coli* P4328 (EC15/17), e outro lote com a cepa de *Klebsiella pneumoniae* P4399 (KB03/17). Os dois lotes foram utilizados nos ensaios de “Pesquisa de *E. coli* em Água” e de “Contagem de Bactérias Mesófilas em Água”. Os lotes foram avaliados quanto à verificação de vácuo, homogeneidade e estabilidade nas temperaturas de referência ($\leq -70^{\circ}\text{C}$) e de armazenamento (-20°C). No teste da homogeneidade, 20 itens de ensaio, de cada um dos lotes, foram separados aleatoriamente e analisados sob condições de repetitividade. Os lotes EC15/17 e KB03/17 foram considerados suficientemente homogêneos e apresentaram concentração final de $4,0 \times 10^2$ UFC/mL e $8,0 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente. Em relação aos resultados do estudo de estabilidade em longa duração, nas temperaturas de armazenamento e de referência, os itens de ensaio foram considerados estáveis. Concluiu-se que os lotes produzidos apresentaram todas as características esperadas para os ensaios de proficiência. Duas rodadas de EP foram realizadas entre setembro e novembro de 2017.

Palavras Chave: Água. Bactérias mesófilas. *Escherichia coli*. Itens de Ensaio. Ensaio de Proficiência.

ABSTRACT

Analytical performance guarantee can be verified through laboratory participation in proficiency tests (PT), which are considered external quality guarantee tools. PT are the use of interlaboratory comparisons for the purpose of evaluating the ability of laboratories to perform a given test or measurement competently and to demonstrate the reliability of the results generated. The objective of this term paper is to produce test items lots in order to be used in two proficiency tests rounds in the counts of mesophilic bacteria and in the research of *Escherichia coli* in drinking water. The preparation procedures of test items and the control analysis were carried out in the Food Sector of the Microbiology Department of INCQS/Fiocruz. Two batches were produced: one, using the *E. coli* strain P4328 (EC15/17), and another batch with *Klebsiella pneumoniae* strain P4399 (KB03/17). For the "Count of Mesophilic Bacteria in Water" and the "*E. coli* Water Research" assay, both batches produced were used. The lots were evaluated for homogeneity, vacuum check and stability at reference ($\leq -70^{\circ}\text{C}$) and storage (-20°C) temperatures. In the homogeneity test, 20 test items, from each batch, were randomly separated and analyzed under repeatability conditions. Lots EC 15/17 and KB 03/17 were considered sufficiently homogeneous and had a final concentration of 4.0×10^2 CFU/mL and 8.0×10^5 CFU/mL, respectively. In relation to the results of the long-term stability study, at storage and reference temperatures, the test items were considered stable. It was concluded that the produced lots had all the expected characteristics for the proficiency tests. Two rounds were carried out between september and november of 2017.

Key Words: Water. Mesophilic Bacteria. *Escherichia coli*. Test Items. Proficiency Test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo produção dos itens de ensaio	234
---	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados gerados nos testes da homogeneidade dos lotes EC15/17 e KB03/17, em UFC/mL.....	277
Tabela 2 - Sumário da análise estatística em \log_{10} UFC/mL.....	277
Tabela 3 - Estudo de estabilidade dos lotes de	288
Tabela 4 - Estudo de estabilidade dos lotes	299
Tabela 5 - Análise de regressão linear do estudo de estabilidade realizado nos lotes.....	299

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APC	Ágar Padrão para Contagem
APHA	<i>American Public Health Organization</i>
BHI	Infusão de cérebro e coração
°C	Graus Celsius
EUA	Estados Unidos da América
FEPAS	<i>Food Examination Performance Assessment Scheme</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
IE	Item de Ensaio
IMViC	Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
Lacen	Laboratório Central de Saúde Pública
L-EMB	Ágar Eosina Azul de Metileno, segundo Levine
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
P-A	Presença Ausência
rpm	Rotações por minuto
SSP	Solução Salina Peptonada
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VRBA	Ágar cristal violeta, vermelho neutro, bile
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	155
1.1 Água	155
1.2 Microrganismos indicadores da qualidade da água para consumo humano.....	166
1.3 Item de ensaio	188
1.4 Ensaio de proficiência	20
1.5 Justificativa	21
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	233
3.1 Produção dos itens de ensaio	233
3.2 Ensaio de controle de qualidade	244
3.3 Teste da homogeneidade	244
3.4 Estudos de estabilidade dos itens de ensaio.....	255
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	266
5 CONCLUSÕES.....	30
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 Água

A água é um bem essencial para a manutenção da vida no planeta. Portanto o abastecimento adequado e de qualidade é uma das grandes preocupações da saúde pública em todo o mundo (WHO, 2010).

A qualidade da água para consumo humano deve ser garantida a partir de ações centradas nos conceitos de vigilância e controle, visando à prevenção de doenças transmitidas pela água, com vistas a promover a qualidade de vida da população, de acordo com as normas vigentes (BRASIL, 2005).

Em 2005 o Ministério da Saúde instituiu o Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (Vigiágua), estruturado a partir dos princípios do Sistema Único de Saúde (SUS), que desempenha um papel importante na garantia da qualidade e segurança da água para consumo humano no Brasil (BRASIL, 2005).

O controle da qualidade da água e as análises laboratoriais em casos de surtos de doenças de transmissão hídrica ocorridos no território brasileiro são de responsabilidade da rede de Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacen) (BRASIL, 2011). A qualidade e confiabilidade dos ensaios realizados para o controle microbiológico da água nestes laboratórios são de suma importância para garantir que os produtos analisados sejam avaliados corretamente e não venham a causar danos à saúde do consumidor. A realização de programas de ensaios de proficiência (EP) no Brasil, na área de microbiologia de água é fundamental para o aumento da confiabilidade dos resultados das medições realizadas, trazendo maior confiabilidade aos resultados emitidos (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2017a; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2017b).

Alterações na água em suas propriedades físico-químicas e microbiológicas podem comprometer sua qualidade, possibilitando o surgimento e agravamento de problemas de saúde na população (BRASIL, 2006a).

A água pode ser o veículo de inúmeras doenças. É importante ressaltar que tanto a qualidade da água como a regularidade de fornecimento são fatores determinantes para o acometimento de doenças no homem (BRASIL, 2006a).

O exame microbiológico da água tem o objetivo de fornecer subsídios a respeito da sua potabilidade, isto é, ausência de risco de ingestão de microrganismos causadores de doenças,

geralmente provenientes da contaminação pelas fezes humanas e outros animais de sangue quente. Os microrganismos presentes nas águas naturais são, em sua maioria, inofensivos à saúde humana, porém na contaminação por esgoto sanitário estão presentes microrganismos que poderão causar doenças (BRASIL, 2013).

A qualidade da água tem influência direta na saúde humana, por isso a partir da década de 70 com o decreto nº 79.367 de 09/03/1977, o Ministério da Saúde (MS) se tornou o órgão competente pela definição do padrão de potabilidade da água para consumo humano no Brasil (BRASIL, 1977). O Decreto determinou que os municípios e estados responsáveis pela operação dos sistemas de abastecimento público, devem adotar obrigatoriamente as normas e o padrão de potabilidade estabelecido pelo Ministério da Saúde. A primeira legislação federal referente a potabilidade de água para consumo humano foi a Portaria MS nº 56, de 14/3/1977, que foi revogada pela Portaria MS nº 36, de 19/1/1990 (BRASIL,1990; BRASIL,2006b). O conceito de potabilidade foi mantido nessa Portaria e os conceitos do grupo coliformes termotolerantes e contagem de bactérias heterotróficas foram descritos, diferentemente da legislação anterior que conceituava somente o grupo de coliformes fecais. Posteriormente, devido a atualização dos estudos e compêndios internacionais, a Portaria foi revisada e substituída pela Portaria nº 518 de 25 de março de 2004, do MS (BRASIL, 2004). Em 2011, uma nova atualização foi realizada e foi publicada a Portaria nº 2914 de 12/12/2011 do MS, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. No ano de 2017 a referida Portaria foi consolidada pela Portaria Nº05 de 03/10/2017 – GM/MS, Capítulo 5, Anexo I. De acordo com a Portaria, na água para consumo humano devem ser realizados os ensaios de contagem de bactérias heterotróficas e pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli* (BRASIL, 2017).

1.2 Microrganismos indicadores da qualidade da água para consumo humano

Bactérias heterotróficas são definidas como microrganismos que requerem carbono orgânico como fonte de nutrientes para seu crescimento e para a síntese de material celular. Concentrações muito elevadas de bactérias heterotróficas podem deteriorar a qualidade da água, provocando odores e sabores desagradáveis (BRASIL, 2013). A contagem total de bactérias heterotróficas não diferencia espécies de microrganismos nem a presença de patógenos, embora a maioria das bactérias patogênicas sejam heterotróficas mesófilas. Desta forma, é importante que sua população seja mantida sob controle, pois o aumento da população dessas bactérias na água pode indicar riscos à saúde do consumidor (WHO, 2010).

A contagem de mesófilos é conhecida como contagem padrão em placa para estimar o número de bactérias heterotróficas viáveis e medir as mudanças durante o tratamento da água, distribuição ou em reservatórios. As colônias crescem em pares, cadeias, grupos ou unitárias sendo todas elas inclusas no termo unidade formadora de colônia (UFC). A contagem final irá depender da interação entre as colônias desenvolvidas (APHA, 2012b). A contagem de bactérias heterotróficas pode ser realizada por plaqueamento em profundidade, plaqueamento em superfície, filtração em membrana ou com uso de placas multi poços com substrato enzimático. Esses métodos fornecem uma quantidade aproximada de bactérias viáveis presentes na amostra, sendo informações importantes sobre a qualidade da água (APHA, 2012b).

De acordo com a legislação brasileira, a contagem padrão de bactérias heterotróficas mesófilas não deve exceder a 500 UFC/mL (BRASIL, 2017).

O grupo dos coliformes totais é um subgrupo da família Enterobacteriaceae que inclui 44 gêneros e 176 espécies (SILVA et al, 2010). Os coliformes totais apresentam como características: bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativa, desenvolvem-se na presença de sais biliares ou agentes tensoativos, fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a $35,0 \pm 0,5$ °C em 24-48 h, e que podem apresentar atividade da enzima β – galactosidase (BRASIL, 2013). Cerca de 20 espécies ou mais se encaixam nessa definição, dentre elas encontramos bactérias provenientes do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente (*E. coli*), como também bactérias não entéricas como os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, dentre outras.

Os coliformes termotolerantes são um subgrupo dos coliformes totais que são capazes de fermentar a lactose em 24 – 48 h a $44,5 \pm 0,2$ °C. Um dos seus principais representantes a *E. coli*, que é tradicionalmente diferenciada dos outros coliformes termotolerantes pelas características de crescimento no ágar L-EMB (Levine Eosina Azul de Metileno) e pelo perfil nos testes de indol, vermelho de metila, *Voges Proskauer* e citrato (IMViC). Os métodos mais modernos diferenciam *E. coli* através da verificação da atividade da enzima β -glicuronidase, produzida por 96% das cepas. A *E. coli* é considerado o mais específico indicador de contaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos (SILVA et al, 2007).

Em 1982 na Austrália e em 1985 nos Estados Unidos da América (EUA) a *E. coli* foi introduzida como indicador de contaminação fecal em água e, conseqüentemente, para alertar quanto a presença potencial de patógenos entéricos como, por exemplo, *Salmonella*. O padrão foi alterado para coliformes totais em 1985 pelo *U.S. Public Health Service*, baseado na premissa questionável de que todos os coliformes apresentavam igual valor como indicadores

de contaminação. Atualmente, a premissa de que altos números de coliformes termotolerantes, coliformes totais ou enterobactérias em alimentos estão correlacionados com contaminação fecal já não é válida, pois os microrganismos citados não são habitantes obrigatórios do trato intestinal de animais de sangue quente podendo ser encontrados em reservatórios ambientais (SILVA et al, 2007).

No Brasil, o padrão de potabilidade estabelecido pela legislação determina a ausência de coliformes totais e de *E. coli* em 100 mL de água (BRASIL, 2017).

1.3 Item de ensaio

A NBR ISO GUIA 30 define materiais de referência (MR) como “Materiais suficientemente homogêneos e estáveis com relação a uma ou mais propriedades específicas, estabelecidas para serem utilizadas em processos de medição”. Esse documento descreve MR como um termo genérico, com propriedades que podem ser de caráter quantitativo ou qualitativo e que devem apresentar a indicação do uso para apenas uma finalidade em um sistema de medição, como controle de qualidade ou calibrador (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016).

Materiais de referência são utilizados em laboratórios de microbiologia de alimentos como parte do seu programa de garantia da qualidade, no controle interno dos ensaios, no treinamento dos colaboradores e como item de ensaio (IE) para ensaios de proficiência (EP) na avaliação da precisão do laboratório (BRANDÃO et al, 2013c).

A instabilidade natural dos microrganismos frente às variações ambientais é um desafio na produção do IE para EP destinados a ensaios microbiológicos, dificultando a produção, desenvolvimento, transporte e uso desses materiais. As variações de temperatura e estresse sofridas durante o processo de dessecação afetam diretamente a célula bacteriana durante a produção do IE (BRANDÃO et al, 2013 a,b)

A matriz mais estudada na produção de IE destinados a ensaios microbiológicos em alimentos é o leite, devido às suas propriedades crioprotetoras intrínsecas (BRANDÃO et al, 2013a,b; ROSAS et al, 2010). A liofilização é o processo mais comumente utilizado na preservação de bactérias (HUBÁLEK, 2003; MORGAN et al, 2006). O diferencial desse processo frente aos outros é permitir a estocagem dos líofílos por longos períodos, com menor risco de contaminação, sem demandar manipulação adicional e manter sob atmosfera de vácuo, diminuindo o metabolismo celular e as reações enzimáticas (CARVALHO et al, 2004; MORGAN et al, 2006). Esse método pode causar danos às células microbianas podendo alterar

a taxa de sobrevivência de determinados microrganismos após sua reidratação (MORGAN et al, 2006). A adição de crioprotetores como carboidratos, proteínas e polímeros tem como objetivo aumentar a viabilidade celular (BRANDAO et al, 2013b). Esses agentes podem ser adicionados durante o crescimento celular ou antes do processo de congelamento, sendo a utilização diferenciada para os distintos grupos de microrganismos (HUBÁLEK, 2003; MORGAN et al, 2006; BRANDAO et al, 2013b).

A capacidade de um microrganismo em sobreviver à desidratação está ligada à capacidade de acumular açúcares intracelularmente, principalmente dissacarídeos como a trealose e sacarose. Os carboidratos possuem a capacidade de substituir a água ligada a proteínas e membranas, evitando a desnaturação proteica e a transição da fase liotrópica dos lipídeos de membrana (OLIVER, HINCHA E CROWE, 2002). As propriedades dos glicídios como a viscosidade e a osmolaridade e suas interações com os componentes químicos celulares, podem influenciar as células antes e durante a liofilização e no processo de reidratação (WESSMAN et al, 2011).

Segundo Brandão e colaboradores (2013b) no seu trabalho de avaliação de crioprotetores na produção de Materiais de Referência (MR) liofilizados para serem utilizados em EP para contagem de coliformes, foram considerados os agentes crioprotetores com melhores resultados a sacarose e a trealose para o preparo do MR em questão.

Outros trabalhos desenvolvidos também mostram a adição de dissacarídeos no preparo de IE como demonstrado por Wessman e colaboradores (2011) que apontaram a melhora da viabilidade celular de bactérias Gram-negativas quando sofreram o processo de liofilização em solução de sacarose a 10% (p/v). Leslie e colaboradores (1995) verificaram que a oferta de trealose e sacarose extracelular aumentaram a estabilidade das membranas de células de *E. coli*.

O êxito na preservação de microrganismos para a produção de IE estará intimamente ligado à formulação da solução na qual a cultura será exposta durante a fase de crescimento, antes dos procedimentos de contaminação da matriz, da velocidade do congelamento, das condições de liofilização e da tolerância intrínseca do microrganismo à desidratação. Um ponto a ser destacado é a fase de crescimento na qual o microrganismo se encontra, pois na fase estacionária, devido à escassez de nutrientes, ocorrem respostas para manter a sobrevivência da célula que culminam na proteção da célula em condições adversas como dessecação e baixas temperaturas (BRANDAO et al., 2013b).

Os IE destinados a análises microbiológicas na área de alimentos disponibilizados por provedores em geral atendem aos escopos de ensaios qualitativos (presença e ausência) e quantitativos para contagem em placas e Número Mais Provável (NMP) (COSTA et al, 2015

(INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2017b; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2017c).

1.4 Ensaio de proficiência

O sistema de garantia da qualidade mais utilizado em laboratórios de ensaio e de calibração é a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 (ABNT, 2017). Um dos requisitos descritos pela norma para a garantia da qualidade dos resultados analíticos é a participação periódica do laboratório em programas de EP e/ou em comparações interlaboratoriais (ABNT, 2017).

Ensaio de proficiência avalia a habilidade de um laboratório em realizar ensaio de forma competente através do uso de comparações interlaboratoriais, avaliando sua capacidade em obter resultados precisos e confiáveis (SÁ, OLIVEIRA, BOTTINO, 2011). A comparação do desempenho obtido entre os laboratórios é possível devido a análise de analitos idênticos, específicos para determinado parâmetro de ensaio (SÁ, OLIVEIRA, BOTTINO, 2011).

Após o preparo, os IE para serem utilizados no EP devem estar suficientemente homogêneos e estáveis, garantindo aos laboratórios participantes do EP o recebimento de unidades com propriedades semelhantes, próximas a um valor padrão (ROSAS et al, 2010; THOMPSON, ELLISON, WOOD, 2006). O material candidato a ser considerado um IE tem que ser submetido ao ensaio de homogeneidade e aos estudos de estabilidade para que seu grau de instabilidade seja verificado. Dadas as variações que os IE podem sofrer antes de chegarem até os participantes do EP, dois tipos de estudos devem ser realizados separadamente: estudo de estabilidade em longa duração, que verifica a estabilidade do IE frente às temperaturas de referência ($\leq -70^{\circ}\text{C}$) e de armazenamento (-20°C); e o estudo de estabilidade em curta duração, que simula as condições de transporte durante a distribuição do IE, onde o material é exposto a diferentes intervalos de tempo e temperaturas (ABNT, 2012).

A participação dos laboratórios em EP é fundamental, pois proporciona a avaliação do desempenho e monitoramento contínuo dos participantes; evidência de obtenção de resultados confiáveis; identificação de problemas relacionados com a sistemática do ensaio; possibilidade de tomada de ações corretivas e/ou preventivas; avaliação da eficiência de controles internos; e reconhecimento dos resultados dos ensaios, em nível nacional e internacional (INCQS, 2017a; INCQS, 2017b).

Com a crescente demanda por provas regulares e independentes de competência pelos organismos reguladores o EP é relevante para todos os laboratórios que avaliam a qualidade de

produtos. Além do baixo número de provedores de EP na área de microbiologia de alimentos, os custos cobrados para a participação nestes ensaios, principalmente de provedores internacionais, são normalmente muito elevados, o que inviabiliza, em muitos casos, a participação de um laboratório em um número maior de ensaios. Sendo assim o desenvolvimento de IE destinados a EP na área de microbiologia de alimentos no Brasil é fundamental, pois irá facilitar a participação dos Lacen e outros laboratórios brasileiros nesses ensaios (COSTA et al, 2015; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2017a; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2017b).

1.5 Justificativa

A qualidade da água é uma das grandes preocupações da saúde pública em todo o mundo. Logo, a qualidade e confiabilidade dos resultados dos laboratórios, principalmente na rede de Laboratórios Centrais de Saúde Pública, que realizam o controle microbiológico da água para consumo humano são de suma importância para garantir que as amostras analisadas sejam avaliadas corretamente e não venham a causar danos à saúde da população. A garantia do desempenho analítico pode ser alcançada através da participação do laboratório em ensaios de proficiência (EP), que é considerada uma ferramenta externa da qualidade.

A produção de IE homogêneos e estáveis em matriz água para a contagem total de bactérias heterotróficas e detecção de coliformes totais e *E. coli*, possibilitará a realização de duas rodadas de EP em nível nacional podendo contribuir para o aumento da confiabilidade dos resultados das análises dos laboratórios e propiciar subsídios para a identificação e solução de problemas analíticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir e avaliar a qualidade de dois lotes de itens de ensaio para serem utilizados em duas rodadas de EP nos ensaios de contagem de bactérias mesófilas e pesquisa de *E. coli* em água de abastecimento.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir dois lotes de itens de ensaio, um contendo *E. coli* e o outro contendo *Klebsiella pneumoniae* pela técnica de liofilização;
- Avaliar a qualidade dos lotes produzidos através dos ensaios de inspeção visual, verificação do vácuo e teste da homogeneidade;
- Realizar os estudos de estabilidade dos lotes produzidos nas temperaturas de referência (≤ -70 °C) e de armazenamento (-20 °C);
- Fornecer os lotes para a Coordenação de EP do INCQS/Fiocruz para a realização de duas rodadas de EP.

3 MATERIAL E MÉTODOS

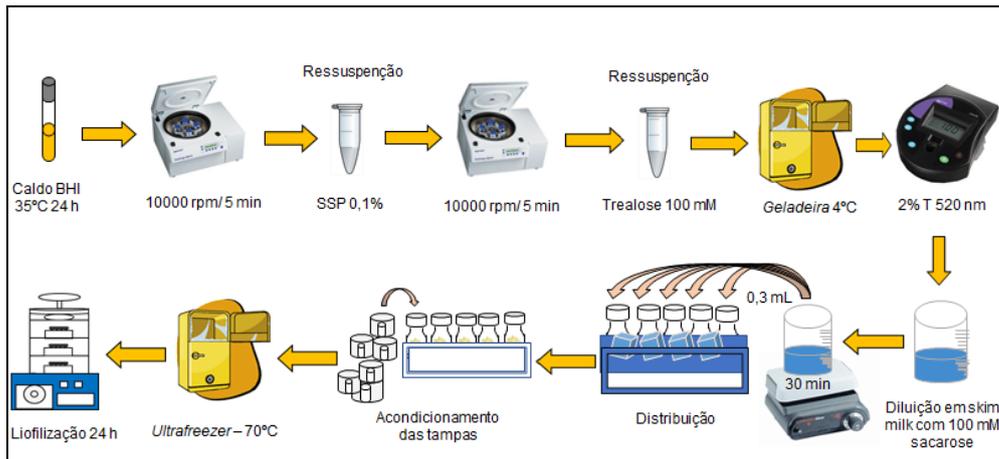
3.1 Produção dos itens de ensaio

Foram produzidos dois lotes de itens de ensaio no Setor de Alimentos do departamento de Microbiologia do INCQ/Fiocruz. O lote EC 15/17 foi preparado com a cepa de *E. coli* depositada na Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz identificada como P4328 e o lote KB 03/17 utilizou a cepa *K. pneumoniae* identificada como P4399. O modo de preparo foi o mesmo para os dois lotes.

Os lotes foram preparados separadamente seguindo o mesmo procedimento de preparo.

Foram retirados 100 µL do criotubo contendo o microrganismo e inoculado em 10 mL de caldo infusão cérebro coração (BHI) (MERCK, Alemanha) e incubado a 35 ± 2 °C por 24 h. Após a incubação 500 µL da cultura foram transferidos para 15 mL de caldo LB acrescido de 2,4% de NaCl e incubado a 35 ± 2 °C por 28 h. Foram transferidos 8 mL da cultura para oito microtubos estéreis com capacidade de 2 mL e centrifugado a 10.000 rotações por minuto (rpm) por 5 min (Eppendorf, 5415D, EUA). O sedimento obtido foi ressuspensionado em solução salina peptonada a 0,1% (SSP 0,1%) e posteriormente centrifugado nas mesmas condições. O sedimento foi ressuspensionado em solução de 100 mM de trealose (MERCK, Alemanha). A suspensão foi ajustada em fotolorímetro (BIOCHROM, Inglaterra) em comprimento de onda de 520 nm, até uma transmitância na faixa de 2%, com o objetivo de se atingir uma concentração aproximada de 2×10^9 UFC/mL. A suspensão ajustada foi acondicionada a 4 °C por 30 minutos. Após esse período, foram realizadas quatro diluições decimais em SSP 0,1% até uma concentração aproximada de 2×10^5 UFC/mL. Dois mililitros da diluição obtida foram adicionados em 198 mL de *skim milk* a 10% com 100 mM de sacarose (MERCK, Alemanha). A suspensão foi homogeneizada em agitador magnético por 30 minutos. Volumes de 0,3 mL foram distribuídos em frascos de vidro estéreis. Após a distribuição os frascos receberam rolhas de borracha próprias para liofilização e foram congelados em *ultrafreezer* a aproximadamente -70 °C por 24 h. Posteriormente, foram submetidos a um ciclo de liofilização (IMALIFE, China) de 24 h como descrito na Figura 1.

Figura 1 - Esquema ilustrativo de produção dos itens de ensaio.



Fonte: (Do autor, 2018).

3.2 Ensaios de controle de qualidade

Logo após a liofilização foi realizada a verificação de vácuo dentro de cada frasco, através de um aparelho emissor de centelha elétrica (Tesla Coil, 2-12-8). Os IE que não apresentaram vácuo ou apresentaram outras características visíveis (rachadura nos frascos, caramelização, etc.) foram descartados. Os frascos aprovados no controle de verificação de vácuo, foram lacrados com tampa de metal, etiquetados e estocados em *ultrafreezer* a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 Teste da homogeneidade

Para a determinação do número mínimo de IE de cada lote a serem analisados no teste da homogeneidade, foi aplicada a fórmula: $3x\sqrt[3]{n}$, onde n é o número de IE produzidos. Desta forma, foram selecionados sistematicamente 20 (vinte) IE de cada lote preparado

Esta avaliação quantitativa foi realizada utilizando a metodologia de contagem de coliformes em ágar cristal violeta, vermelho neutro bile (VRBA) (DIFCO, EUA) segundo o *Bacteriological Analytical Manual* (APHA, 2012).

Os itens de ensaio submetidos a análise foram reconstituídos com 1 mL de SSP 0,1%. Após 15 minutos, a suspensão bacteriana foi homogeneizada. Os IE do lote Kb 03/17 foram submetidos a diluições decimais antes de serem analisados, primeiramente foi realizada uma diluição (1:100) homogeneizando 0,1 do líófilo com 9,9 mL de SSP 0,1% e uma diluição (1:10) com 1 mL da diluição anterior com 9 mL de SSP 0,1%. Os IE do lote EC 15/17 não foram submetidos a diluição.

Para as contagens, volumes de 0,5 mL dos IE do lote EC 15/17 reconstituídos e volumes foram transferidos para placa de Petri estéril. Posteriormente, cada placa foi acrescida de 10 mL

de Ágar Padrão para Contagem (APC) (MERCK, Alemanha), homogeneizada e incubada a 35°C. Após 4 horas de incubação uma sobrecamada de 10 mL de ágar VRBA foi adicionada a placa, posteriormente incubada por aproximadamente 44 horas.

Para os IE do lote Kb 03/17, volumes 0,5 mL da segunda diluição preparada foram homogeneizados com 20 mL de APC. As placas foram incubadas por 48 horas.

Após o período de incubação das placas foi realizada a contagem das colônias e calculados os valores das contagens. O número de colônias obtidos foi multiplicado pelo volume e pelo inverso da diluição utilizada e expresso em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro.

A avaliação estatística teve como base o Protocolo Harmonizado (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2006). Para a avaliação estatística os valores calculados em UFC/mL foram transformados em Log

3.4 Estudos de estabilidade dos itens de ensaio

Foi realizado o estudo de estabilidade em longa duração nas temperaturas de armazenamento (-20 °C) e de referência (\leq -70 °C) para ambos os lotes produzidos KB 03/17 e EC 15/17.

A metodologia analítica empregada para ambos os lotes produzidos foi a mesma do estudo de homogeneidade (item 3.3). As avaliações estatísticas foram realizadas com os valores das contagens em Log, segundo a ABNT ISO GUIA 35 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2012), que preconiza a análise de resíduos da regressão linear.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O preparo dos itens de ensaio teve como base os estudos descritos por Brandão et al (2013b) que produziram IE com a cepa *E.coli* tipo I (BRANDÃO et al, 2013b; JAY, 2005). A adição de sacarose na solução de skim milk a 10% teve a finalidade de proteger a membrana plasmática, além de permitir que a sacarose penetrasse e se acumulasse por difusão passiva, aumentando assim a estabilidade da membrana durante a liofilização, como relatado por Leslie e colaboradores (1995) em células liofilizadas de *E. coli*. e Wessman e colaboradores (2011) em bactérias Gram-negativas liofilizadas em solução de sacarose a 10%.

Os lotes de IE, após a etapa de liofilização, apresentaram concentrações de $4,0 \times 10^2$ UFC/mL para *E. coli* e $8,0 \times 10^5$ UFC/mL para *K. pneumoniae*, que eram as concentrações esperadas no plano da rodada dos lotes.

A produção de lote EC15/17 gerou 202 frascos, cinco destes não apresentaram vácuo, sendo o percentual de frascos com vácuo 97,5%. O lote KB03/17 teve um total de 207 frascos produzidos e todos os frascos apresentaram vácuo (100%). Ambos lotes não apresentaram rachadura nos frascos, caramelização, liquefação, sinais de colapso estrutural ou qualquer outro tipo de características visíveis que impedissem a utilização futura dos itens. Resultados similares no teste de verificação de vácuo foram obtidos por Brandão et al (2013b) que produziram quatro lotes de IE tendo como matriz solução de leite desnatado a 10% com variações nos crioprotetores adicionados (glicerol 10% (p/v), 100 mM de sacarose, 100 mM de trealose e ausência de crioprotetor) com 100% de vácuo.. Monteiro e colaboradores (2017) obtiveram na produção de dois lotes de IE contendo oxitetraciclina em leite 100% de vácuo em um e 97,4% no outro. Brandão e colaboradores (2014) produziram nove lotes de IE com matriz em carne bovina com média de 94,2% de frascos com vácuo. Em relação à inspeção visual todos os líofilos apresentaram coloração branca e ausência de brilho como nos estudos de Brandão et al (2013a) e Rosas et al (2010) onde foram utilizados o mesmo processo de liofilização em matriz leite desnatado a 10% na produção de IE.

Os resultados das contagens do teste da homogeneidade dos lotes EC15/17 e KB03/17 estão apresentados na Tabela 1. Para cada item foram realizadas duas análises gerando duas contagens (A e B).

Tabela 1 - Dados gerados nos testes da homogeneidade dos lotes EC15/17 e KB03/17, em UFC/mL.

Item de Ensaio	Lote de <i>Escherichia coli</i>				Lote de <i>Klebsiella pneumoniae</i>			
	Contagem		Log ₁₀		Contagem		Log ₁₀	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	490	552	2,69	2,74	730000	810000	5,86	5,91
2	300	430	2,48	2,63	770000	620000	5,89	5,79
3	544	426	2,74	2,63	660000	510000	5,82	5,71
4	350	508	2,54	2,71	670000	670000	5,83	5,83
5	306	794	2,49	2,90	860000	660000	5,93	5,82
6	182	690	2,26	2,84	600000	910000	5,78	5,96
7	256	630	2,41	2,80	590000	690000	5,77	5,84
8	528	34	2,72	1,53	820000	690000	5,91	5,84
9	534	522	2,73	2,72	770000	880000	5,89	5,94
10	304	640	2,48	2,81	650000	540000	5,81	5,73
11	494	612	2,69	2,79	340000	550000	5,53	5,74
12	488	534	2,69	2,73	690000	750000	5,84	5,88
13	536	594	2,73	2,77	660000	620000	5,82	5,79
14	466	542	2,67	2,73	570000	460000	5,76	5,66
15	556	586	2,75	2,77	520000	490000	5,72	5,69
16	336	686	2,53	2,84	500000	570000	5,70	5,76
17	386	734	2,59	2,87	590000	620000	5,77	5,79
18	662	590	2,82	2,77	500000	610000	5,70	5,79
19	672	690	2,83	2,84	590000	690000	5,77	5,84
20	662	406	2,82	2,61	540000	740000	5,73	5,87

Em **vermelho** resultados *outlier*, retirados da análise.

Fonte: (INCQS, 2017b).

Os resultados da análise estatística do teste da homogeneidade dos lotes produzidos podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2 - Sumário da análise estatística em log₁₀ UFC/mL

Lote	Média	σ_p	σ_{all}^2	s_{an}^2	s_{an}^2	c	Resultado
<i>E. coli</i>	2,69	0,25	0,00562	0,02808	0,00000	0,02562	Homogeneidade Suficiente
<i>K. pneumoniae</i>	5,80	0,25	0,0562	0,00447	0,00294	0,01147	Homogeneidade Suficiente

Fonte: (INCQS, 2017b).

O lote de KB03/17 não apresentou nenhum valor aberrante (*outlier*), porém o lote de EC15/17 apresentou um *outlier* que foi retirado da análise estatística. Os lotes foram considerados suficientemente homogêneos com desvio-padrão alvo (σ_p) atribuído de 0,25; pois atenderam aos critérios da verificação da precisão da homogeneidade do Protocolo Harmonizado, cuja variância entre as amostras deve ser menor que o valor crítico ‘c’ (THOMPSON, ELLISON E WOOD, 2006).

O parâmetro σ_p descreve a incerteza-padrão que é mais apropriada para a área de aplicação dos resultados da análise, ou em outras palavras, “adequada ao propósito”. Ela não é necessariamente próximo da incerteza associada aos resultados relatados, pois essa função é frequentemente considerada uma definição de “adequação aos propósitos” (THOMPSON, ELLISON E WOOD, 2006; BRANDÃO et al, 2013a). O σ_p atribuído neste estudo foi 0,25 \log_{10} UFC/mL, o mesmo adotado por outros autores, como Brandão e colaboradores (2013a, 2013b), e Rosas e colaboradores (2010), na produção de IE para EP, e por provedores internacionais como o *Food Examination Performance Assessment Scheme* (FEPAS). Portanto, os IE produzidos neste estudo foram considerados suficientemente homogêneos e aplicáveis a utilização em EP.

Os resultados das médias em \log_{10} das contagens dos dois itens utilizados no estudo da estabilidade em longa duração na temperatura de -70°C (temperatura de referência) e de -20°C (temperatura de armazenamento) dos lotes EC15/17 e KB03/17 estão descritos nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. O tempo “zero” foi considerado como a média das contagens do teste de homogeneidade.

Tabela 3 - Estudo de estabilidade dos lotes de EC15/17 e KB03/17 na temperatura de referência (-70°C) UFC/mL.

Dias	<i>Escherichia coli</i>			Dias	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	Média Item 1	Média Item 2	Log das Médias		Média Item 1	Média Item 2	Log das Médias
0	530	500	2,71	0	560000	750000	5,81
21	580	630	2,78	29	520000	640000	5,76
41	370	410	2,59	49	560000	570000	5,75
63	450	530	2,69	70	460000	490000	5,68
86	520	490	2,70	91	480000	330000	5,60
107	510	500	2,70	113	480000	470000	5,68
126	540	490	2,71	133	590000	600000	5,77
145	430	190	2,46				

Fonte: (INCQS, 2017b).

Tabela 4 - Estudo de estabilidade dos lotes EC15/17 e KB03/17 na temperatura de armazenamento (-20 °C) UFC/mL.

Dias	<i>Escherichia coli</i>			Dias	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	Média Item 1	Média Item 2	Log das Médias		Média Item 1	Média Item 2	Log das Médias
0	424	578	2,69	0	618016	644169	5,80
7	500	400	2,65	7	420000	790000	5,76
30	450	190	2,47	27	520000	510000	5,71
33	510	490	2,70	42	550000	470000	5,71
48	440	470	2,66	56	570000	740000	5,81
65	360	400	2,58	70	510000	590000	5,74
84	440	510	2,68	94	530000	520000	5,72

Fonte: (INCQS, 2017b).

Os dois lotes foram considerados suficientemente estáveis durante o período avaliado, de acordo com a ABNT ISO GUIA 35 (2012). O intervalo de confiança a 95% abrange o valor “zero”, conforme visualizado na Tabela 5.

Tabela 5 - Análise de regressão linear do estudo de estabilidade realizado nos lotes EC15/17 e KB03/17.

	Coeficiente Angular Inferior	Erro Padrão	Intervalo de Confiança		Resultado
			Inferior	Superior	
Referência (<i>E. coli</i>)	-0,00098	0,00069	-0,00267	0,00071	Estável
Referência (<i>K. pneumoniae</i>)	-0,00073	0,00062	-0,00231	0,00085	Estável
Armazenamento (<i>E. coli</i>)	-0,00021	0,00123	-0,00338	0,00296	Estável
Armazenamento (<i>K. pneumoniae</i>)	-0,00042	0,00053	-0,00178	0,00095	Estável

Fonte: (INCQS, 2017b).

Os lotes apresentaram valores do coeficiente angular em módulo baixos em ambas temperaturas avaliadas no estudo de estabilidade de longa duração (Tabela 5), demonstrando pouca variação da concentração celular no período estudado, com perspectiva de serem estáveis nesta condição por um período muito mais longo. Logo, a sacarose propiciou uma maior resistência às células bacterianas devido ao seu efeito crioprotetor sobre os microrganismos presentes na matriz. Os resultados são similares aos obtidos no estudo de produção de IE contendo *E. coli* produzido na mesma matriz (leite desnatado a 10 % contendo 100 mM de sacarose), que apresentaram os menores valores em módulo do coeficiente angular em todas as temperaturas avaliadas no estudo de estabilidade de curta duração quando comparados aos outros lotes com outros crioprotetores e sem crioproteção (BRANDÃO, 2013b).

5 CONCLUSÕES

- A técnica de liofilização se mostrou eficiente na produção de dois lotes de IE, um contendo *E. coli* (EC15/17) com 202 frascos e o outro contendo *K. pneumoniae* (KB03/17) num total de 207 frascos;
- Os lotes EC15/17 e KB 03/17 apresentaram o percentual de vácuo de 97% e 100%, respectivamente. No teste de inspeção visual não apresentaram características visíveis que impeçam a utilização dos lotes.
- Os lotes produzidos se apresentaram suficientemente homogêneos. Quanto à estabilidade em longa duração, o lote EC 15/17 se apresentou estável durante 145 dias na temperatura de referência (≤ -70 °C) e durante 84 dias na temperatura de armazenamento (-20 °C). O lote KB 03/17 se apresentou estável durante 133 dias na temperatura de referência e 94 dias na temperatura de armazenamento.
- Os lotes EC15/17 e KB 03/17 produzidos nesse estudo foram utilizados em duas rodadas de EP fornecidas pela Coordenação de EP do INCQS/Fiocruz. O EP de Contagem de Bactérias Mesófilas em Água contou com a participação de 21 laboratórios (INCQS, 2017a). A rodada de Pesquisa de *E. coli* em Água teve a participação de vinte e sete laboratórios (INCQS, 2017b).

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO/GUIA 30**: termos e definições relacionados com materiais de referência. Rio de Janeiro, 2016.

_____. **ABNT ISO/IEC 17043**: avaliação de conformidade: requisitos gerais para ensaios de proficiência. Rio de Janeiro, 2017.

_____. **ABNT ISO GUIA 35**: materiais de referência – princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro, 2012.

_____. **ABNT NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração, Rio de Janeiro, 2017.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22. ed. Washington, D.C., 2012a. p. 9-1

_____. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22. ed. Washington, D.C., 2012b. p. 9-49-9-52

_____. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22. ed. Washington, D.C., 2012c. p. 9-73

BRANDÃO, M.L.L. et al. Produção de materiais de referência para avaliação de métodos microbiológicos em alimentos: estafilococos coagulase positiva e *Listeria* spp. em leite em pó. **Revista Analytica**, v. 63, n. 1, p 60-71, 2013a.

BRANDAO, M.L.L. et al. Avaliação de crioprotetores na produção de material de referência para enumeração de coliformes em leite em pó a ser utilizado em ensaio de proficiência. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 72, n. 2, p 144-150, 2013b.

BRANDAO, M. L. L. et al. Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo estafilococos coagulase positiva em matriz queijo. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 73-79, 2013c.

BRANDAO, M. L. L. et al. Avaliação de matrizes de carne bovina na produção de itens de ensaio de proficiência para pesquisa de *Salmonella* spp. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 25, n. 1, p. 13-8, 2014.

BRASIL. Decreto nº 79.367 de 09 de março de 1977. Dispõe sobre normas e o padrão de potabilidade de água e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 mar. 1977. Seção 1.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual prático de análise de água.**/ 4. ed. Brasília, 2013, 150p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 56, de 14 de março de 1977. Dispõe sobre normas e o padrão nacional de potabilidade da água para consumo humano, a serem observadas em todo território nacional. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 mar. 1977. Seção 1, p. 7447.

_____. Portaria nº 36, de 19 de janeiro de 1990. Dispõe sobre as normas e o padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano, a serem observados em todo o território nacional. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 jan. 1990. Seção 1, p. 1651.

_____. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 mar. 2004. Seção 1, p. 266-270.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. **Programa Nacional de Vigilância em Saúde Ambiental relacionada à qualidade da água para consumo humano**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005. (Série C. Projetos, Programas e Relatórios).

_____. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano**. Brasília, 2006a. 212 p.

_____. **Documento base de construção e revisão da Portaria n.º 36/MS/1990**. Brasília, 2006b. 108 p.

BRASIL. Portaria MS nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância e da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 3, p.43, 04 jan. 2012. Seção 1.

BRASIL. Portaria de Consolidação Nº 05, de 28 de setembro de 2017 GM/MS. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União** nº 190, de 03 de out. 2017.

CARVALHO, A.S. et al. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.14, n. 10, p 835-847, 2004.

COSTA, J. C. B. et al. Preparo de itens de ensaio de proficiência em matriz queijo para a pesquisa de *salmonella* spp.. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 3, n. 3, p. 11-18, 2015.

FENG, P. et al. Enumeration of *Escherichia coli* and Coliform Bacteria. In: Bacteriological analytical manual online. USA: FDA, 2002. Capítulo 4. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm064948.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2018

HUBÁLEK Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**. v.46, n. 3, p. 205-229, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos 25ª rodada – contagem de bactérias mesófilas em água**: EP MIB 25/17. Rio de Janeiro: INCQS, Fiocruz, 2017a. 25 p.

_____. **Ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos 26ª rodada – pesquisa de escherichia coli em água**: EP MIB 26/17. Rio de Janeiro: INCQS, Fiocruz, 2017b. 17 p.

_____. **Ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos 27ª rodada – pesquisa de salmonella spp. em frango**: EP MIB 27/17. Rio de Janeiro: INCQS, Fiocruz, 2017c. 17 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 13528**: statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. Geneva, 2005.

JAY, J. M. Indicadores Microbiológicos de qualidade e segurança dos alimentos. In: JAY, JM (ed.). **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artemd, 2005. p. 413-31.

MONTEIRO, M. A. et al. Produção de material de referência de oxitetraciclina em leite em pó desnatado. **Revista Científica UBM**, v. 19, n. 36, p. 146-160, 2017.

MORGAN, C.A. et al. Preservation of microorganisms by drying; A review. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, n. 2, p. 183-93, 2006.

OLIVER, A.E.; HINCHA, D.K.; CROWE, J.H. Looking beyond sugars: the role of amphiphilic solutes in preventing adventitious reactions in anhydrobiotes at low water contents. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 131, n.3, p. 515-525, 2002.

ROSAS, C. O et al. Desenvolvimento de material de referência para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.1, p.15-22, 2010.

SÁ, A.; OLIVEIRA, C.A; BOTTINO, L. Ensaio de proficiência. In: OLIVEIRA, CA; MENDES, ME. **Gestão da fase analítica do Laboratório**: como assegurar a qualidade na prática. Rio de Janeiro: Control Lab. v.2, p. 47-97, 2011.

SHULTEN, S. M. et al. **The certification of the number of colony forming particles of *salmonella typhimurium* and number fraction of negative capsules from artificially contaminated milk powder: CRM 507R**. Belgium: European Commission, 2001. Disponível em: <<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC21325>>. Acesso em: 02 jan. 2018.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Editora Edgar Blücher Ltda, 2010. p. 119-120

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical chemistry laboratories. **Pure and Applied Chemistry**, v.78, n.1, p.145-196, 2006

WESSMAN, P. et al. Impact of matrix properties on the survival of freeze-dried bacteria. **Journal of Scientific Food Agricultural**, v.91, p.2518-2528, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for drinking-water quality. 4. ed. v. 1, 2010.